



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101762705 A

(43) 申请公布日 2010.06.30

(21) 申请号 201010001679.8

(22) 申请日 2010.01.21

(71) 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街 427 号

(72) 发明人 仇华吉 王向鹏 孙元

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 11139
代理人 孙皓晨 费碧华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

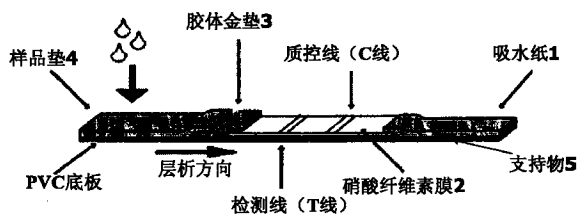
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

(54) 发明名称

检测猪瘟病毒野毒的胶体金免疫层析试纸条

(57) 摘要

本发明公开了一种检测猪瘟病毒野毒的胶体金免疫层析试纸条,由吸水纸(1)、硝酸纤维素膜(2)、胶体金垫(3)、样品垫(4)和支持物(5)组成;所述的硝酸纤维素膜含有一条由抗猪瘟病毒E2蛋白的单克隆抗体HQ06包被而成的检测线和由兔抗鼠IgG抗体包被而成的质控线;所述的胶体金垫结合由胶体金标记的抗猪瘟病毒E2蛋白的单克隆抗体6E10。本发明试纸条不与猪瘟兔化弱毒、牛病毒性腹泻病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪轮状病毒、伪狂犬病病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒2型反应,能够准确、灵敏的鉴别诊断猪瘟病毒野毒,具有良好的特异性、敏感性和重复性。



1. 一种检测猪瘟病毒野毒的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:由吸水纸(1)、硝酸纤维素膜(2)、胶体金垫(3)、样品垫(4)和支持物(5)组成;所述的硝酸纤维素膜(2)含有一条由抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 HQ06 包被而成的检测线和由兔抗鼠 IgG 抗体包被而成的质控线;所述的胶体金垫(3)结合由胶体金标记的抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 6E10;其中,吸水纸(1)、硝酸纤维素膜(2)和胶体金垫(3)按照以下次序相连接并附着在支持物(5)上:胶体金垫(3)与靠近硝酸纤维素膜(2)上的检测线的一端相连接,吸水纸(1)与靠近硝酸纤维素膜(2)上的质控线的一端相连接;样品垫(4)的一端附着在胶体金垫(3)上,胶体金垫(3)的另一端与硝酸纤维素膜(2)相衔接。

2. 按照权利要求 1 所述的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:所述的支持物(5)是塑料板、硬纸板或铝板。

3. 按照权利要求 1 所述的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述的胶体金垫按照以下方法制备得到:

(1) 制备胶体金颗粒:取 0.01% 的氯金酸 100mL,搅拌状态加热至 90℃,加入 1.8mL 1% 柠檬酸三钠溶液,柠檬酸三钠与氯金酸溶液充分混匀后,降低搅拌器的转速,继续加热维持整个反应体系温度在 95℃;当溶液颜色由浅黄色变成酒红色时,停止加热,冷却至室温;用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 将胶体金溶液 pH 值调至 8.2,用 0.22 μm 滤膜过滤后装入洁净的玻璃瓶中,4℃ 避光保存;

(2) 制备胶体金标记的抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 6E10 溶液:将 6E10 单抗与胶体金溶液用磁力搅拌器混合;加入 5% 的 BSA 溶液至终浓度为 1%,离心 20min 弃沉淀;10,000r/min 离心 60min,弃上清;沉淀物用 0.02mol/L 硼酸盐缓冲液稀释至原体积的 1/10,4℃ 保存备用;其中,6E10 单抗与胶体金溶液的标记量为 18.75 $\mu g/mL$;

(3) 取玻璃纤维纸,将其浸入步骤(2)所制备的胶体金标记的抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 6E10 溶液中 1h,室温干燥,即得。

4. 一种制备权利要求 1 所述胶体金免疫层析试纸条的方法,包括:

(1) 将抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 6E10 和兔抗鼠 IgG 抗体间隔 4-6mm 喷在硝酸纤维素膜(2)上,分别作为检测线和质控线,将包被好的硝酸纤维素膜封闭其余蛋白结合位点,洗涤,干燥,备用;

(2) 将硝酸纤维素膜(2)、胶体金垫(3)、样品垫(4)、吸水纸(1)按照以下次序粘在支持物上:将胶体金垫连接在靠近硝酸纤维素膜检测线的一端,边缘附着在硝酸纤维素膜上,样品垫附着在胶体金垫的另一端上;吸水纸连接在硝酸纤维素膜的另一端,与硝酸纤维素膜的质控线相接近;

(3) 将粘好的支持板材料切成 3mm 宽的试纸条,即得。

检测猪瘟病毒野毒的胶体金免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种鉴别猪瘟病毒的试纸条,尤其涉及一种鉴别猪瘟病毒野毒的胶体金免疫层析试纸条,属于猪瘟病毒的诊断和鉴别领域。

背景技术

[0002] 猪瘟(classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起猪的一种急性、发热性、接触性传染病。世界动物卫生组织(OIE)将该病列入须申报动物传染病名录。我国采用免疫猪瘟兔化弱毒疫苗(hog choleralapinized vaccine, HCLV)很好地预防和控制了猪瘟在我国的大规模流行,但近年来猪瘟又有卷土重来、死灰复燃的迹象,且其流行和发病特点又发生了许多新变化,目前仍是危害我国养猪业的主要传染病之一(王琴.猪瘟病毒流行病学、病原致病特性及猪瘟综合防制研究.中国农业科技导报,2006,8(5):13-18.)。在发病初期进行快速、灵敏、准确的病原学诊断,是控制猪瘟流行的重要环节,它可以使基层兽医在疫情爆发时在现地确诊,及早采取措施控制疾病的流行。

[0003] 胶体金免疫层析技术是20世纪90年代发展起来的一种新型体外诊断技术(Tanaka R, Yuhi T, Nagatani N, et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. Anal Bioanal Chem, 2006, 385(8):1414-1420.)。该诊断方法快速简便,操作简单,无需仪器,结果准确。其基本原理是利用微孔滤膜的渗滤浓缩和毛细层析作用,使抗原抗体在固相膜上反应,然后用胶体金标记的抗体显色,阳性反应在膜上呈现红色,阴性反应则不出现红色。已经报道的猪瘟胶体金诊断技术,主要基于猪瘟病毒抗体定量检测和病原定性检测,对猪感染CSFV野毒或接种免疫弱毒疫苗不能进行鉴别诊断。根据CSFV野毒和弱毒核酸序列差异建立的套式PCR技术和荧光定量PCR技术,能区分CSFV野毒和弱毒,主要用于进行实验室诊断,不适合现地检测。

[0004] 中国采用免疫猪瘟兔化弱毒疫苗很好地控制了猪瘟在我国的大规模的流行,但是由于缺乏利用血清学标志和配套的鉴别诊断方法,使得通过抗体检测很难区分免疫弱毒和野毒感染,这非常不利于猪瘟的净化(仇华吉,童光志,沈荣显.猪瘟兔化弱毒疫苗——半个世纪的回顾.中国农业科学,2005,38(8):1675-1685.)。因此,通过抗原检测对猪免疫弱毒和感染野毒进行鉴别诊断的检测方法就势在必行。

发明内容

[0005] 本发明首先所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种能够准确、灵敏的鉴别诊断CSFV野毒的胶体金免疫层析试纸条。

[0006] 本发明所要解决的技术问题是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 一种检测CSFV野毒的胶体金免疫层析试纸条,由吸水纸1、硝酸纤维素膜2、胶体金垫3、样品垫4和支持物5组成;所述的硝酸纤维素膜2含有一条由抗猪瘟病毒E2蛋白

的单克隆抗体 HQ06 包被而成的检测线和由兔抗鼠 IgG 抗体包被而成的质控线 ;所述的胶体金垫 3 结合由胶体金标记的抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 6E10 ;其中,吸水纸 1、硝酸纤维素膜 2 和胶体金垫 3 按照以下次序相连接并附着在支持物 5 上 :胶体金垫 3 与靠近硝酸纤维素膜 2 检测线的一端相连接,吸水纸 1 与靠近硝酸纤维素膜 2 质控线的一端相连接 ;样品垫 4 的一端附着在胶体金垫上,胶体金垫的另一端与硝酸纤维素膜 2 相衔接。

[0008] 其中,所述的支持物只要具有一定的硬度,将样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水垫负载于其上,达到支持和负载的目的即可,可以选用各种材料作为本发明的支持物,例如塑料板(优选为 PVC)、硬纸板、铝板等。

[0009] 所述的抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 HQ06 可按照文献所公开的方法制备得到 (Peng WP, Hou Q, Xia ZH, et al. Identification of a conserved linear B-cell epitope at the N-terminus of the E2 glycoprotein of Classical swine fever virus by phage-displayed random peptide library. *Virus Res*, 2008, 135 (2) :267-272.) ;

[0010] 所述的兔抗鼠 IgG 抗体可按照文献所公开的方法制备得到 (Zhang GP, Wang XN, Yang, JF, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β -adrenergic agonist Clenbuterol residues. *J Immunol Methods*, 2006, 312 (1-2) :27-33.) ;

[0011] 所述的胶体金垫可参考以下方法制备得到 :

[0012] (1) 制备胶体金颗粒 :取 0.01% 的氯金酸 100mL, 搅拌状态加热至 90℃, 加入 1.8mL 1% 柠檬酸三钠溶液, 柠檬酸三钠与氯金酸溶液充分混匀后, 降低搅拌器的转速, 继续加热维持整个反应体系温度在 95℃ 左右 ;当溶液颜色由浅黄色变成酒红色时, 停止加热, 冷却至室温 ;用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 将胶体金溶液 pH 值调至 8.2, 用 0.22 μ m 滤膜过滤后装入洁净的玻璃瓶中, 4℃ 避光保存 ;

[0013] (2) 制备胶体金标记的抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 6E10 溶液 :将 6E10 单抗与胶体金溶液用磁力搅拌器混合 ;加入 5% 的 BSA 溶液至终浓度为 1%, 离心 20min 弃沉淀 ;10,000r/min 离心 60min, 弃上清 ;沉淀物用 0.02mol/L 硼酸盐缓冲液稀释至原体积的 1/10, 4℃ 保存备用 ;其中, 6E10 单抗与胶体金溶液的标记量为 18.75 μ g/mL ;

[0014] (3) 取玻璃纤维纸, 将其浸入步骤 (2) 所制备的胶体金标记的抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 6E10 溶液中 1h, 室温干燥, 即得。

[0015] 所述的抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 6E10 可参考文献所公开的方法制备得到 (彭伍平. 利用噬菌体展示技术鉴定猪瘟病毒 E2 蛋白抗原表位. 北京 :中国农业科学院, 2007)。

[0016] 在胶体金免疫层析试纸条研制过程中, 制备出高质量的胶体金是实验成功的关键。高质量的胶体金颗粒要求颗粒外形均一、尺寸变异系数小、且可以在硝酸纤维素膜上自由流动。本发明在制备胶体金颗粒过程中与以往报道的方法有所改进 :在使用磁力加热搅拌器过程中, 采用了降低反应温度, 使整个反应体系温度控制在 95℃ 左右, 当柠檬酸三钠与氯金酸溶液混匀后, 迅速降低了磁力搅拌器转子的转速。通过以上的改进可以最大程度的降低胶体金颗粒之间的聚集, 且可以得到大小均一的颗粒。在制备的胶体金过程中, 胶体金颗粒的大小与还原剂的加入量有关, 本实验经过条件优化, 确定 100mL 0.01% 的氯金酸溶液中加入最佳柠檬酸三钠的量为 1.8mL, 制备出直径为 25nm 的金颗粒, 这一尺寸的颗粒大

小适中,易于辨识,又不影响蛋白质与金颗粒表面的结合,可以使标记的蛋白获得最佳的性能。

[0017] 所述硝酸纤维素膜(该硝酸纤维素膜也可由尼龙膜来替换)上的检测线和对照线之间的间隔优选为 4-6mm,更优选为 5mm。

[0018] 一种制备上述试纸条的方法,包括:

[0019] (1) 将抗猪瘟病毒 E2 蛋白的单克隆抗体 6E10 和兔抗鼠 IgG 抗体间隔 4-6mm 喷在硝酸纤维膜上,分别作为检测线和质控线,将包被好的硝酸纤维膜封闭其余蛋白结合位点,洗涤,干燥,备用;

[0020] (2) 将硝酸纤维膜、胶体金垫、样品垫、吸水纸按照以下次序粘在支持物上:将胶体金垫连接在靠近硝酸纤维膜检测线的一端,边缘附着在硝酸纤维素膜上,样品垫附着在胶体金垫的另一端上;吸水纸连接在硝酸纤维素膜的另一端,与硝酸纤维素膜的质控线相接近;

[0021] (3) 将粘好的支持物材料切成 3mm 宽的试纸条,即得。

[0022] 本发明试纸条的检测方法

[0023] (1) 待检样品的处理

[0024] 将猪瘟病毒接种到对数生长期的 PK15 细胞,72h 后弃去细胞培养液,刮下感染细胞,加入 1/2 原培养液体积的含 1% NP-40 的 0.01mol/L PBS 缓冲液 (pH7.2),室温下涡旋震荡,放置 1h,其间不时用涡旋器混合。然后 2500r/min 4℃离心 10min,取上清做被检抗原。取不接毒的 PK15 细胞按照上述方法处理作为阴性对照。

[0025] (2) 样品检测

[0026] 取 100 μ L 处理好的样品滴入样品垫,10 ~ 15min 内观察实验结果。

[0027] (3) 结果判定如图 2 所示。

[0028] 阳性:检测线和质控线均出现清晰红色条带。样品中猪瘟病毒含量越高,检测线红色颜色越深。

[0029] 阴性:只有质控线出现红色条带。

[0030] 无效:质控线不出现红色条带。

[0031] CSFV E2 囊膜糖蛋白在不同毒株间高度保守 (Weiland E, Stark R, Haas B, et al. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of disulfide-linked heterodimer. *J Virol*, 1990, 64(3): 3563-3569; Meyers G, Rumenapf T, Thiel H. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, 1989, 171(2): 555-567.), 本试验通过利用抗 CSFV E2 蛋白的单抗建立的胶体金免疫层析检测方法可以直接用于检测细胞样品中的 CSFV 抗原。对抗原的特异性识别主要借助单抗的高度特异性。试验所使用的抗 CSFV E2 蛋白单抗经过间接免疫荧光实验证明可以和 CSFV 全病毒发生反应。其中 6E10 单抗能和本发明人所分离各种基因型的猪瘟病毒野毒发生反应,但与 HCLV 不发生反应。用胶体金标记 6E10 单抗作为捕捉抗体,能够实现 CSFV 野毒鉴别诊断的目的,提高了检测的特异性。

[0032] 由于 CSFV 在细胞培养物中其滴度不是太高,且由于胶体金检测试纸条敏感性的限制,因此对检测样品的处理也是实验成功的关键因素之一。在 PK15 细胞接毒后 72h 收毒,通过将细胞反复冻融作为检测样品并没有达到预期的实验目的。按照参考文献 (Shannon

AD, Morrissy C, Mackintosh SG, et al. Detection of hogcholera virus antigens in experimentally-infected pigs using an antigen-capture ELISA. *Vet Microbiol*, 1993, 34(3) :233-248.) 收集培养的细胞,采用 NP-40 涡旋的方法,破坏了细胞膜,使病毒粒子充分地 从细胞中释放出来,这样利于单抗对抗原的捕捉,取得了预期的实验结果。通过对不同基因亚型 CSFV 细胞培养物的检测,证明该方法敏感性、特异性和重复性都较好。

[0033] 在试纸条组装过程中,样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸之间的位置要恰当,各层之间的衔接处要压紧压实。由于试纸条的组件大部分是由亲水性物质组成的,特别是硝酸纤维素膜,这就要求试纸条在组装前要充分干燥。若试纸条保存环境中 有水分存在,容易使硝酸纤维素膜上的抗体发生水解、解离或疏水折叠,导致抗体的生物活性降低而影响检测结果的正确性。

[0034] 试验结果表明,本发明所制备的试纸条用于检测猪瘟疫病毒野毒感染的 PK15 细胞培养物,在检测线和质控线处均出现红色条带,未感染病毒的细胞培养物仅在质控线出现红色条带;试纸条检出病毒培养物的最低限为 $10^{3.5} \text{TCID}_{50}$;用不同批次的试纸条重复检测,结果无差异;本发明试纸条不与猪瘟疫化弱毒、牛病毒性腹泻病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪轮状病毒、伪狂犬病病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型反应。所制备的试纸条具有较好的特异性和敏感性,重复性良好。

附图说明

[0035] 图 1 胶体金免疫层析试纸条结构。

[0036] 图 2 胶体金免疫层析试纸条结果判定;1:阳性;2:阴性;3:无效。

[0037] 图 3 胶体金颗粒透射电镜照片($\times 30,000$)。

[0038] 图 4 胶体金免疫层析试纸条的特异性;分别用胶体金免疫层析试纸条检测 CSFV Shimen 株、兔化弱毒(HCLV)、BVDV、PRRSV、TGEV、PEDV、PRV、PrV、PPV 和 PCV-2 感染的细胞培养物。

[0039] 图 5 用胶体金免疫层析试纸条对不同基因型猪瘟疫病毒的检测结果。

[0040] 图 6 胶体金免疫层析试纸条的敏感性试验结果。

具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0042] 实施例 1 本发明检测试纸条的制备

[0043] 1 材料与方法

[0044] 1.1 主要试剂与仪器

[0045] 氯金酸(HAuCl_4)、柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、碳酸钾(K_2CO_3)、牛血清白蛋白(BSA)和聚乙烯醇购自 Sigma 公司;硼酸(H_3BO_3)购自 Amreso 公司;重组蛋白 G 琼脂糖亲和层析柱购自 Invitrogen 公司;小鼠 IgG 购自 Bioszune 公司;去离子水购自北京天根公司。硝酸纤维素膜(NC 膜)为深圳伊能公司产品;吸水纸、玻璃纤维、胶板购自上海金标生物科

技有限公司 ;ZX3000 喷膜机、CM4000 切条机购自美国 Bio-Dot 公司 ;猪瘟疫病毒抗原 ELISA 检测试剂盒购自 IDEXX 公司。

[0046] 1.2 病毒株

[0047] CSFV 石门系强毒株 (Shimen)、2 种不同基因亚型的 CSFV 野毒株 [1.1 基因亚型 : HLJ-1(06)、HLJ-3(06)、HeN-5(06) 和 HeN-3(06) ;2.1 基因亚型 :HuN1(06)、SH-7(06)、SH11-0701 和 SX-09]、猪瘟兔化弱毒疫苗株 (HCLV)、牛病毒性腹泻病毒 I 型 (BVDV-1) BA 株、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) HuN4 株、传染性胃肠炎病毒 (TGEV) H16 株、猪流行性腹泻病毒 (PEDV) CV777 株、猪轮状病毒 (PRV) OSU 株、伪狂犬病病毒 (PrV) HLJ 株、猪细小病毒 (PPV) BQ 株、猪圆环病毒 2 型 (PCV2) LG 株和 4 个不同厂家生产的 10 个批次的猪瘟兔化弱毒疫苗均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所猪传染病研究室保存并提供。

[0048] 1.3 单克隆抗体、兔抗鼠 IgG 抗体的制备与纯化

[0049] 特异性识别 CSFV 野毒的单抗 6E10 (彭伍平 . 利用噬菌体展示技术鉴定猪瘟病毒 E2 蛋白抗原表位 . 北京 : 中国农业科学院, 2007.) 和识别猪瘟病毒一个线性表位的单抗 HQ06 由 (Peng WP, Hou Q, Xia ZH, et al. Identification of a conserved linear B-cell epitope at the N-terminus of the E2 glycoprotein of Classical swine fever virus by phage-displayed random peptide library. *Virus Res*, 2008, 135(2) : 267-272.) 可分别按照文献所公开的方法制备得到。

[0050] 兔抗鼠 IgG 抗体制备的免疫程序按照已报道的方法 (Zhang GP, Wang XN, Yang, JF, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β -adrenergic agonist Clenbuterol residues. *J Immunol Methods*, 2006, 312(1-2) : 27-33.) 进行, 采用双向琼脂扩散试验 (杨汉春 . 动物免疫学 . 北京 : 中国农业大学出版社, 2003, 297-298.) 测定血清效价, 制备的血清用蛋白 G 亲和层析柱纯化, SDS-PAGE 法鉴定其纯度, 用 Pierce 公司 BCA 法测定蛋白浓度。

[0051] 1.4 胶体金颗粒的制备

[0052] 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 用磁力加热搅拌器加热 : 取 0.01% 的氯金酸 100mL, 搅拌状态加热至 90℃, 迅速加入 1.8mL 新配制的 1% 柠檬酸三钠溶液, 柠檬酸三钠与氯金酸溶液充分混匀后, 降低搅拌器的转速, 继续加热维持整个反应体系温度在 95℃ 左右。当溶液颜色由浅黄色变成酒红色时, 停止加热, 冷却至室温。用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 将胶体金溶液 pH 值调至 8.2, 用 0.22 μ m 滤膜过滤后装入洁净的玻璃瓶中, 4℃ 避光保存。用透射电子显微镜观察胶体金颗粒的大小与均一度。

[0053] 1.5 胶体金标记单抗的制备

[0054] 1.5.1 单抗与胶体金最佳标记量的选择

[0055] 按照参考文献进行 (Sun XL, Zhao XL, Tang J. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. *Int J Food Microbiol*, 2005, 99(2) : 185-194.), 最终通过试验确定 6E10 单抗与胶体金溶液的最佳标记量为 18.75 μ g/mL。

[0056] 1.5.2 胶体金标记单抗的制备

[0057] 根据上述实验结果, 取最佳单抗的量与胶体金溶液用磁力搅拌器混合 30min。加入 5% 的 BSA 溶液至终浓度为 1%。2,000r/min 离心 20min 弃沉淀 ; 10,000r/min 离心 60min,

弃上清。沉淀物用 0.02mol/L 硼酸盐缓冲液 (pH 8.2, 含 1% 的 BSA 和 0.1% 叠氮钠) 稀释至原体积的 1/10, 4℃ 保存备用。

[0058] 1.6 胶体金垫的制备

[0059] 取玻璃纤维纸, 将其浸入胶体金标记的单抗溶液中 1h, 室温干燥后 4℃ 保存备用。

[0060] 1.7 硝酸纤维素膜印膜的制备

[0061] 检测线 (Test line, T 线) 和质控线 (Control line, C 线) 抗体工作浓度按照参考文献 (蒋韬, 梁仲, 陈涓, 等. 口蹄疫病毒 O、A、AsiaI 型定型诊断胶体金免疫层析方法的建立. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3801-3808.) 确定, 将硝酸纤维素膜放在喷膜仪上, 将浓度为 2mg/mL 的 HQ06 单抗放在 X-only 单向喷膜仪贮存池 A, 浓度为 2mg/mL 的兔抗鼠 IgG 抗体放在贮存池 B, 开机后将 HQ06 单抗和兔抗鼠 IgG 抗体分别喷于膜中央, 形成间距 0.5cm 的检测线 (T 线) 和质控线 (C 线)。将 NC 膜在室温下干燥 1h, 用含有 1% 聚乙烯醇的 20mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液室温封闭 30min, 封闭后用去离子水漂洗一次, 室温自然干燥, 4℃ 保存备用。

[0062] 1.8 试纸条的组装

[0063] 将上述方法制备的胶体金垫、硝酸纤维素膜、样品垫、吸水纸和胶板 (PVC 板) 按照图 1 的顺序装配, 裁成宽度为 3mm 的诊断试纸条。

[0064] 试验例 1 本发明检测试纸条各项性能的评价试验

[0065] 1.1 特异性试验

[0066] 用试纸条分别检测 CSFV 石门株和不同基因型 CSFV 野毒株、HCLV、BVDV、PRRSV、TGEV、PEDV、PRV、PrV、PPV 和 PCV2, 根据检测结果判定其特异性。

[0067] 1.2 敏感性试验

[0068] 将半数细胞培养感染剂量 (TCID₅₀) 为 10⁵ 的猪瘟病毒样品, 用 PBS 进行梯度稀释, 将试纸条检测到得猪瘟病毒阳性参考样品的最高稀释倍数 (最小病毒滴度) 定为试纸条的灵敏度。

[0069] 1.3 重复性试验

[0070] 用不同批次生产的试纸条重复检测猪瘟病毒阳性和阴性参考样品, 按照上述方法进行的操作和判定。

[0071] 1.4 与抗原 ELISA 的符合性试验

[0072] 将本研究中所有检测样品用 IDEXX 公司猪瘟病毒抗原 ELISA 检测试剂盒进行检测, 比较胶体金试纸条检测结果与 ELISA 的符合性。

[0073] 1.5 保存期试验

[0074] 将试纸条保存于 4℃, 每隔 1 个月取出检测阳性、阴性参考样品。

[0075] 2 试验结果

[0076] 2.1 兔抗鼠 IgG 抗体的纯度及效价

[0077] 纯化后兔抗鼠 IgG 多抗经 SDS-PAGE 电泳分析, 纯度可以达到 95% 以上。双向琼脂扩散试验测定兔抗鼠 IgG 血清效价为 1 : 32。

[0078] 2.2 胶体金颗粒的形态

[0079] 制备的胶体金通过透射电子显微镜观察颗粒的大小和均一程度。测得 100 个金颗粒的平均直径为 25nm, 符合标记单抗的要求 (图 3)。

[0080] 2.3 标准样品的检测结果

[0081] 标准猪瘟阳性和阴性样品经胶体金免疫层析试纸条检测,结果与预期相符:阳性样品在试纸条上出现两条清晰可见的红色条带,阴性样品仅在对照线出现一条红色条带。

[0082] 2.4 胶体金试纸条的检测性能

[0083] 2.4.1 特异性

[0084] 将实施例 1 所制备的胶体金免疫层析试纸条对不同的病毒样品进行检测,结果表明,该试纸条与猪的其他常见病毒反应呈阴性(图 4),而与各基因型的猪瘟病毒反应成阳性(图 5)。与不同厂家生产的猪瘟兔化弱毒疫苗反应也均呈阴性反应。

[0085] 分别用胶体金免疫层析试纸条检测 CSFV Shimen 株、兔化弱毒(HCLV)、BVDV、PRRSV、TGEV、PEDV、PRV、PrV、PPV 和 PCV-2 感染的细胞培养物。

[0086] 2.4.2 敏感性

[0087] 将 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 的 CSFV 用 PBS 稀释成 TCID₅₀ 分别为 $10^{4.5}/0.1\text{mL}$ 、 $10^{4.0}/0.1\text{mL}$ 、 $10^{3.5}/0.1\text{mL}$ 和 $10^{3.0}/0.1\text{mL}$ 的病毒液。分别用本发明胶体金免疫层析条试纸条检测,每个稀释度重复两次。结果表明,本发明试纸条检测 CSFV 的最低限为 $10^{3.5}$ TCID₅₀(图 6)。

[0088] 2.4.3 重复性

[0089] 用不同批次的本发明试纸条分别检测阳性病毒细胞培养物和阴性细胞培养物,每个批次重复检测 3 次,结果均无明显差异,说明该试纸条具有良好的重复性。

[0090] 2.4.4 胶体金免疫层析试纸条与抗原 ELISA 的符合性

[0091] 将本发明胶体金免疫层析试纸条对样品的检测结果与抗原 ELISA 检测结果进行符合,两者具有较高的符合率。当样品中病毒含量较高时,两者的符合率可达到 100%(表 1)。

[0092] 2.4.5 保存期

[0093] 本发明胶体金免疫层析试纸条在 4℃ 保存 6 个月内,取出检测阴性和阳性参考样品,测试显色程度和显色时间无显著性差异,说明其保存期至少可达 6 个月。

[0094] 表 1 胶体金免疫层析试纸条与抗原 ELISA 检测结果比较

[0095]

病毒	OD ₄₅₀ 值	ELISA 检测结果	试纸条检测结果
CSFV Shimen	1.213	+	+
CSFV HLJ-1(06)	1.012	+	+
CSFV HLJ-3(06)	1.114	+	+
CSFV HeN-5(06)	1.011	+	+
CSFV HeN-3(06)	1.105	+	+
CSFV HuN1(06)	1.103	+	+
CSFV SH-7(06)	0.992	+	+
CSFV SH11-0701	0.983	+	+
CSFV SX-09	0.896	+	+
HCLV	0.031	—	—
BVDV	0.007	—	—
PRRSV	0.021	—	—
TGEV	0.067	—	—
PEDV	0.039	—	—
[0096]			
PRV	0.064	—	—
PrV	0.039	—	—
PPV	0.079	—	—
PCV2	0.087	—	—
阳性对照	1.023	+	+
阴性对照	0.085	+	—

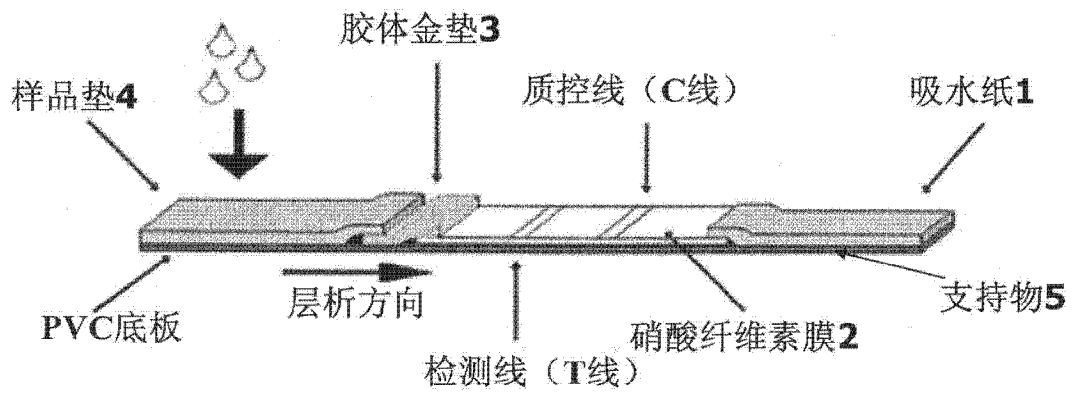


图 1

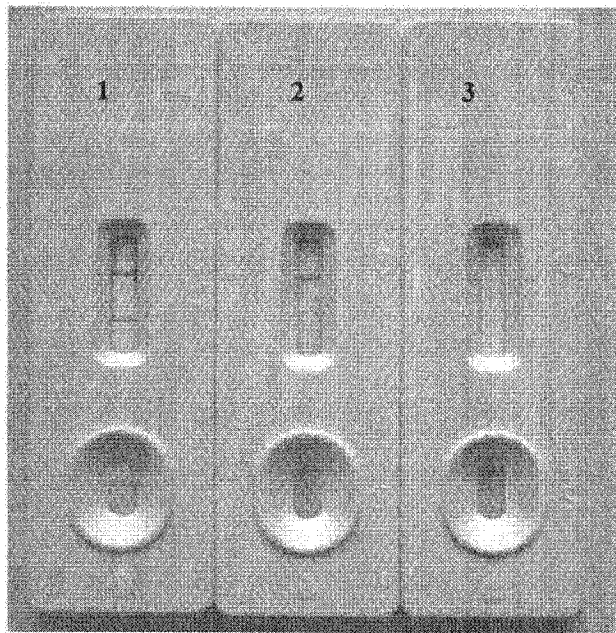


图 2

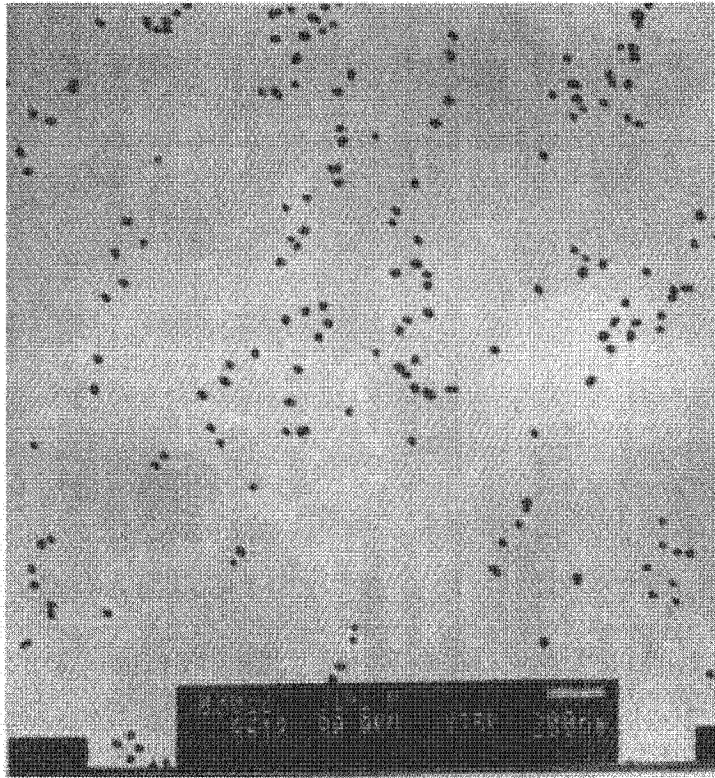


图 3

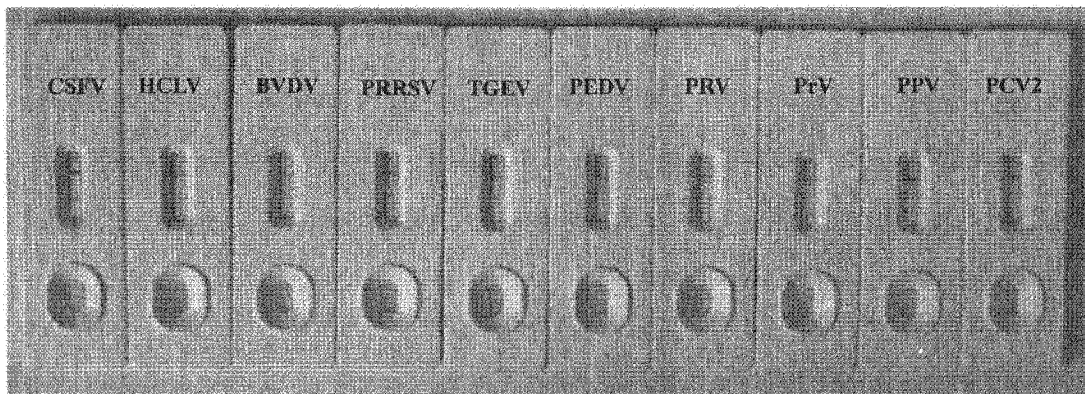


图 4

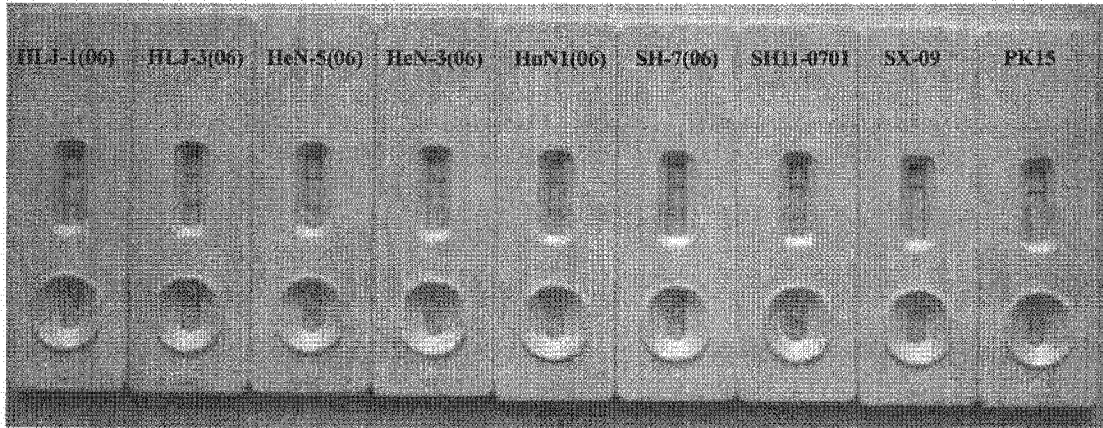


图 5

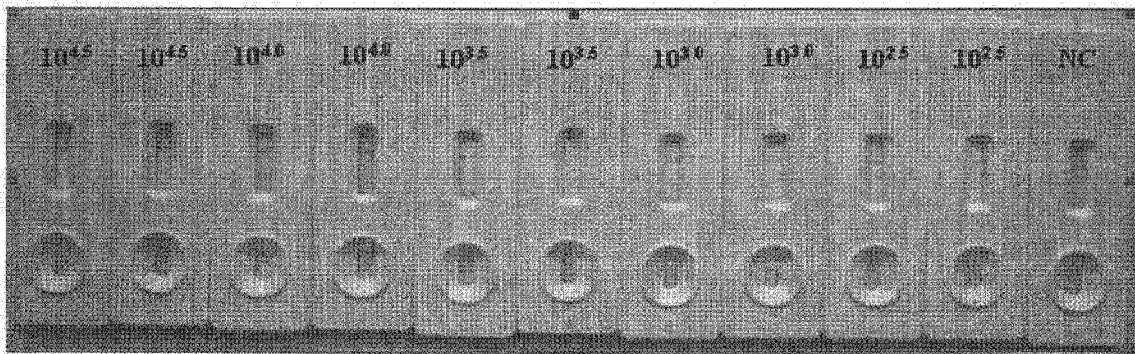


图 6

专利名称(译)	检测猪瘟病毒野毒的胶体金免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN101762705A	公开(公告)日	2010-06-30
申请号	CN201010001679.8	申请日	2010-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	仇华吉 王向鹏 孙元		
发明人	仇华吉 王向鹏 孙元		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	孙皓晨		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测猪瘟病毒野毒的胶体金免疫层析试纸条，由吸水纸(1)、硝酸纤维素膜(2)、胶体金垫(3)、样品垫(4)和支持物(5)组成；所述的硝酸纤维素膜含有一条由抗猪瘟病毒E2蛋白的单克隆抗体HQ06包被而成的检测线和由兔抗鼠IgG抗体包被而成的质控线；所述的胶体金垫结合由胶体金标记的抗猪瘟病毒E2蛋白的单克隆抗体6E10。本发明试纸条不与猪瘟兔化弱毒、牛病毒性腹泻病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪轮状病毒、伪狂犬病病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒2型反应，能够准确、灵敏的鉴别诊断猪瘟病毒野毒，具有良好的特异性、敏感性和重复性。

